

Obtención de biomasa de microalga *Chlorella vulgaris* en un banco de prueba de fotobiorreactores de columna de burbujeo

Pedro A. Rodríguez Ramos^a, Yuniór Sánchez Miranda^b, Lourdes M. Zumalacárregui de Cárdenas^c, Osney Pérez Ones^c, Ana Hernández Milán^d, Pedro Echeveste de Miguel^e, Ana Teresa Lombardi^e

^aGrupo Combustibles Alternativos, Facultad de Ingeniería Mecánica, ^bGrupo Biotecnología Aplicada, ^cGrupo Análisis de Procesos, Facultad de Ingeniería Química, Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría (Cujae), Cuba. Calle 114 No. 11901 e/ Ciclovía y Rotonda, Marianao, La Habana, Cuba. ^dDepartamento de Mecanización y Transporte, Empresa de Mantenimiento del Petróleo (EMPET), Cuba. ^eLaboratório de Biotecnologia de Algas, Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Brasil.

Biomass production from Chlorella vulgaris microalgae in bubble column photo-bioreactors

Obtenció de biomassa de microalga Chlorella vulgaris en un banc de prova de fotobiorreactors de columna de bombolleig

Recibido: 25 de octubre de 2014; revisado: 7 de mayo de 2015; aceptado: 27 de mayo de 2015

RESUMEN

Dada la agudización de la situación socioeconómica y medioambiental que se enfrenta en la actualidad, los investigadores buscan nuevas alternativas para sustituir el combustible fósil convencional, siendo una salida, los biocombustibles obtenidos a partir de microalgas. El objetivo de esta investigación fue la obtención de biomasa en un banco de prueba de fotobiorreactores de columna de burbujeo, utilizando una cepa de *Chlorella vulgaris* en medio Bristol. Se dimensionó el fotobiorreactor y se evaluó la influencia de las variables pH y concentración de nitrógeno, con y sin presencia de oligoelementos, sobre la productividad del crecimiento de la biomasa de microalgas. Se encontró que en el intervalo estudiado (pH entre 6 y 8 y concentración de NaNO₃ entre 0,5 y 1 g/L) estas variables no tienen un efecto significativo en el crecimiento, mientras que la presencia de oligoelementos favorece este.

Palabras claves: Microalgas; fotobiorreactor; biomasa.

SUMMARY

Due to the current increase of economic and environmental problems, researchers around the world are looking for new alternatives to substitute the use of conventional fossil fuels, such as the use of biofuel obtained from microalgae. The main goal of this investigation was biomass production in vertical photobiorreactors from *Chlorella vulgaris* growing in Bristol medium. Photobiorreactor's dimensioning was done. Influence of pH and nitrogen concentration on microalgae biomass growth was evaluated. Experiments were done with and without traces elements.

NaNO₃ concentration (0.5- 1 g/L and pH (6-8) didn't influence the biomass growth. Meanwhile, traces had shown a positive effect.

Keywords: Microalgae; photobiorreactor; biomass.

RESUM

Donada l'agudització de la situació socioeconòmica i mediambiental que existeix en l'actualitat, els investigadors busquen noves alternatives per substituir el combustible fòssil convencional, i els biocombustibles obtinguts a partir de microalgues són una sortida. L'objectiu d'aquesta investigació va ser l'obtenció de biomassa en un banc de prova de fotobiorreactors de columna de bombolla, utilitzant una soca de *Chlorella vulgaris* en un medi Bristol. Es va dimensionar el fotobiorreactor i es va avaluar la influència de les variables pH i concentració de nitrogen, amb i sense presència d'oligoelements, sobre la productivitat del creixement de la biomassa de microalgues. Es va trobar que en l'interval estudiat (pH entre 6 i 8 i concentració de NaNO₃ entre 0,5 i 1 g/L) aquestes variables no tenen un efecte significatiu en el creixement, mentre que la presència d'oligoelements afavoreix aquest creixement.

Paraules clau: Microalgues; fotobiorreactor; biomassa.

*Autor para la correspondencia: ^apedro_jandro3@yahoo.com; ^byuniór@quimica.cujae.edu.cu; ^clourdes@quimica.cujae.edu.cu; osney@quimica.cujae.edu.cu; ^dahernandez@empet.cupet.cu; ^eechevestepedro@gmail.com; lombardi@ufscar.br

INTRODUCCIÓN

Durante la última década del siglo pasado, la preocupación creciente sobre el agotamiento del petróleo y las emisiones de gases de efecto invernadero, que provocan el calentamiento global, motivaron numerosas investigaciones relacionadas con la producción de combustibles a partir de biomasa vegetales [1-3]. Así, comenzó a aprovecharse la biomasa procedente de diferentes plantas oleaginosas comestibles como maíz, girasol, soya, coco, palma, *Jatropha*, colza o canola, además de remolacha y cereales, alternativa que provocó un escándalo mundial debido a la crisis alimentaria que sufre el mundo, sobre todo en los países subdesarrollados. Más tarde se implementó el uso de residuos agrícolas o de especies maderables para obtener biodiesel, los que poseen una capacidad de producción mayor, sin embargo eran necesarias amplias zonas fértiles para cultivos forestales y no se resolvieron todos los problemas generados por la presencia de la lignina y de la hemicelulosa. Esto conllevó a seguir desarrollando nuevas fuentes de energías alternativas, incluyendo el uso de microalgas como fuente para la producción de biodiesel [1, 4, 5].

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos procariontes y eucariontes, capaces de utilizar nutrientes como el dióxido de carbono (CO_2), agua y energía solar para producir biomasa y se consideran interesantes en este contexto ya que poseen un elevado contenido en aceites (hasta un 60% en peso) [6, 7]. Además, pueden crecer extremadamente rápido, entre 10 y 200 veces más rápido que los cultivos terrestres como la soya y la colza [4], viven en condiciones no muy favorables [8] y se localizan en hábitats diversos como agua de mar, agua dulce, agua salobre, aguas residuales o en el suelo, bajo un amplio intervalo de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes, debido a su estructura unicelular o multicelular simple [9]. Tienen una alta productividad, pues con pequeñas áreas de cultivo se pudiera abastecer grandes demandas energéticas [7].

La biomasa de las algas contiene tres componentes principales: las proteínas, cuyo porcentaje sobre el peso seco puede variar del 46-63%; los carbohidratos, con porcentajes generalmente entre el 10-17% (hasta 32% en *Dunaliella salina*) [6]; y los lípidos, con porcentajes que varían del 4-61% [7, 9, 10]. En menor medida (<6%) se encuentran los ácidos nucleicos [7, 11]. De todas ellas, los lípidos son las biomoléculas de mayor interés en el proceso de obtención de biocombustibles.

Existen dos formas principales de cultivar microalgas: en sistemas abiertos tipo carrusel o en sistemas cerrados, denominados fotobiorreactores. Los primeros son baratos y fáciles de operar, pero presentan desventajas como una evaporación excesiva y facilidad de contaminación. Los sistemas cerrados permiten una alta productividad, menor uso de agua y menor contaminación, pero resultan más costosos y en ellos se da una mayor acumulación de O_2 [3]. Así, las microalgas son capaces de producir 8 000 m^3 de aceite/ km^2 de área cultivada [7].

Dada su mayor producción lipídica y de biomasa respecto a otras especies, *Chlorella vulgaris* resulta idónea para su explotación como fuente de ácidos grasos para la producción de biodiesel, con una composición lipídica promedio de 27,8%. Esta especie es fácilmente adaptable a diferentes condiciones de cultivo y sustratos, característica deseable para cultivos a gran escala, y presenta un corto

ciclo de crecimiento, disminuyendo los riesgos de contaminación con especies no deseadas [10].

Es por ello que en el presente trabajo se determinó la influencia de las variables pH y concentración de nitrógeno, c(N), con y sin presencia de oligoelementos, sobre la productividad del crecimiento de la biomasa de estas microalgas.

MATERIALES Y METODOS

Condiciones de crecimiento

Se trabajó con la microalga *Chlorella vulgaris*. La cepa utilizada se obtuvo del cepario del Laboratorio de Ecotoxicología del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA) con el código F010102-A, donde se conserva desde el 2002, a una temperatura constante de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y luz continua ($19,5 \mu\text{Em}^2\text{s}^{-1}$) suministradas por lámparas fluorescentes Daylight 40 W. El medio estéril utilizado fue el sugerido por Bristol [12] utilizando nitrato de sodio (NaNO_3) como fuente de nitrógeno. Se seleccionó un fotobiorreactor de columna de burbujeo para la evaluación del crecimiento de biomasa a partir de *Chlorella vulgaris*.

Influencia del pH y de la concentración de nitrógeno del medio Bristol en el crecimiento

Para evaluar la influencia de estas variables sobre la productividad de las microalgas se realizó un diseño de experimentos donde los factores fueron pH y c(N), a dos niveles con un punto central y una réplica del punto central, siendo la cantidad de experimentos totales seis y la variable respuesta densidad celular (DC, células mL^{-1}). Los niveles para el pH fueron entre 6 y 8, y para el NaNO_3 entre 0,5 y 1 g/L, como se aprecia en la Tabla 1. Se realizaron dos diseños de experimentos, uno con oligoelementos (elementos trazas) llamado diseño experimental 1 y otro sin oligoelementos, llamado diseño experimental 2.

Tabla 1. Niveles para los factores del diseño de experimentos.

Parámetro	Fotobiorreactor					
	A	B	C	D	E	F
pH	6	6	7	7	8	8
c(NaNO_3)	0,50	1,00	0,75	0,75	0,50	1,00

Etapas para obtener biomasa de microalgas a partir del sistema desarrollado

Precultivo de la microalga

Se preparó una cepa de *Chlorella vulgaris* a partir de un cultivo sólido en cuña de agar y se desarrolló un subcultivo matriz asincrónico (discontinuo) de una sola microalga en Erlenmeyers de 100 mL, que transcurridos 5 días se trasladaron a Erlenmeyers de 500 mL y posteriormente a frascos de vidrio de 2 L durante el mismo período de tiempo. En esta fase el cultivo se encontraba en condiciones de fotoautotrofia con aireación, sin suministro extra de CO_2 , con un régimen de luz continua a una densidad de flujo fotónico (DFF) de 3 000 lux ($58,59 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$) utilizando lámparas fluorescentes Daylight 40W.

Siembra de las microalgas en los fotobiorreactores

Se inoculó el 10% del volumen efectivo del fotobiorreactor, se añadieron 2 L del medio de cultivo y 5,2 L de agua destilada necesarios para completar 8 L y se ajustaron las variables pH y concentración de nitrógeno del medio según el diseño experimental. El cultivo se aireó con un compresor KAESER KOMPRESSOREN, del tipo KCT 190-23

durante 150 h. Se monitoreó el crecimiento de la biomasa de microalgas cada 24 horas, tomando una alícuota del cultivo y determinando la DC en cámara de recuento hematológica Neubauer mejorada, utilizando un microscopio óptico MOTIC (40x).

Separación mecánica de las microalgas del medio acuoso
Al pasar el período de cultivo, 150 horas, se detuvo el compresor y se cerraron las entradas de aire a los fotobiorreactores, quedando la biomasa dispersa en todo el volumen. Se realizó la separación por sedimentación-floculación, añadiendo una solución de sulfato de aluminio (Al_2SO_4)₃ con una concentración de 0,1 g/L en proporción de 1 mL de solución por cada 500 mL de cultivo. Se agitó y se dejó en reposo por 24 horas. Posteriormente, se eliminó el agua remanente, succionándola con una manguera por el tope, dejando en el fondo las microalgas en medio acuoso.

Secado y obtención de biomasa

Se secaron las microalgas utilizando bandejas de 30 cm x 40 cm x 4 cm expuestas al sol de 8 am a 11:30 am; se colocaron en pequeñas casas de cultivo tapado hasta las 4 pm. Después se guardaron en un lugar seco hasta el otro día. La biomasa seca se retiró de las bandejas y se almacenó en pequeños frascos para su posterior pesaje.

Análisis estadístico

Para analizar la influencia de las variables pH y c(N) en la DC se realizó un análisis de varianza, ANOVA con auxilio del programa STATGRAPHICS Centurion XV versión 15.2.05. Para la comparación de los resultados de DC obtenidos utilizando y sin utilizar oligoelementos, se emplearon las pruebas W de Mann-Whitney para comparar medianas y la de Kolmogorov-Smirnov para comparar las dos distribuciones, al no presentar las muestras una distribución normal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta las ventajas y desventajas de los distintos sistemas de cultivo, así como las posibilidades reales de montaje en Cuba y factibilidad económica, se seleccionó el fotobiorreactor de columna de burbujeo por ser compacto, de bajo costo, fácil de operar, presentar alta transferencia de masa y buena mezcla, tener un bajo consumo de energía y no ocurrir la fotoinhibición con facilidad. Sus principales inconvenientes son las pequeñas áreas de iluminación superficial, en comparación a otros fotobiorreactores como el de placa plana o el tubular, así como requerir materiales más costosos para su construcción [13]. En total seis fueron los fotobiorreactores utilizados para este estudio (Figura 1).



Figura 1. Cultivo de microalgas a las 150 horas.

El criterio para el dimensionamiento del fotobiorreactor fue empírico, determinado por las experiencias referenciadas en la literatura.

Diámetro (d): Se sugiere en la bibliografía que el diámetro de las columnas no debe ser superior a 0,2 m [14] ya que la disponibilidad de la luz se verá severamente reducida pero si es muy pequeño se verá afectado el crecimiento de las microalgas, ya que las temperaturas serán muy elevadas. Hay que llegar a un consenso entre temperatura y disponibilidad de la luz para lograr un crecimiento óptimo de las microalgas. Según Montero y colaboradores [10] con 0,1 m de diámetro el crecimiento se vio afectado por elevadas temperaturas. Se seleccionó un diámetro de 0,15 m debido a que la disponibilidad lumínica en todo el fotobiorreactor es aproximadamente la misma y no hay elevados excesos de temperaturas, haciendo innecesario un medio de intercambio de calor para controlar esta variable.

Altura (H): La altura de la columna debe ser como máximo 4 m [14], de lo contrario la concentración de oxígeno disuelto aumenta exponencialmente. Se consideró como criterio el de $H = 3 \cdot d$

El cálculo del volumen total del fotobiorreactor (8L) se realizó según la ecuación 1:

$$V = h \cdot \pi \cdot r^2 \quad (1)$$

En la Figura 2 se muestra el fotobiorreactor construido.

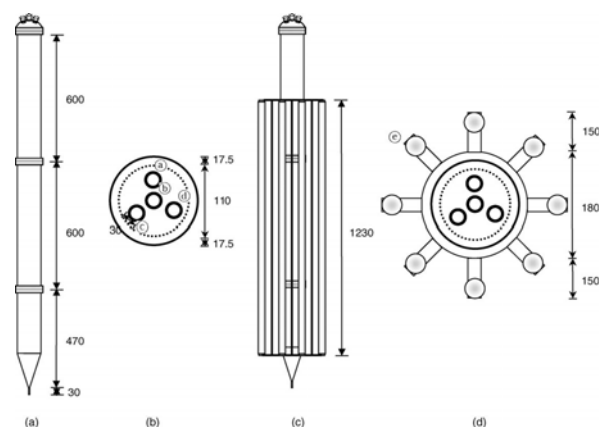


Figura 2. Dimensiones y características del fotobiorreactor.

Base: Plana cuadrada de vidrio de 0,25 cm de arista.

Tapa: Plana circular de 16 cm de diámetro de poliestireno expandido. Cuenta con un orificio central al que se le acopló un accesorio en forma de "T" con el objetivo de que al llover, no penetraran gotas de lluvia; también se colocaron algodones en los extremos de la "T" para que no entraran organismos no deseados y no interfiera con la salida de los gases.

Rociador: Manguera con orificios igualmente espaciados en forma de serpentina con el objetivo de que exista homogeneidad en todo el medio de cultivo.

Entrada de CO₂: Orificio en la tapa con un conducto que lo lleva hasta el fondo.

Fuente de luz: Radiación solar.

Nutrientes: Medio de cultivo Bristol.

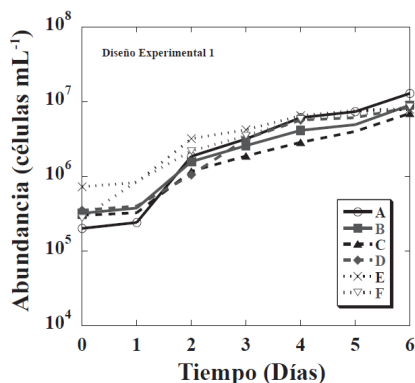
Manejo de aire: Compresor KAESER KOMPRESSOREN, del tipo KCT 190-23, con una presión final de 700 kPa y un flujo de 190 L min⁻¹, acoplado con un motor eléctrico COBURG, frecuencia de 60 Hz, de 1 680 min⁻¹, voltaje de 110 V, corriente 15 A y potencia de 1,1 kW. El aire

se transportó por mangueras de 1 cm de diámetro, hasta llegar a los fotobiorreactores. El flujo se reguló a 1 100 L h⁻¹ con una llave Hoffman. Se midieron los flujos con un rotámetro MLW-13811451 del tipo LD #1737, alemán; que tiene un intervalo de medición de 200- 2 000 Lh⁻¹. Con un flujo de 1 100 Lh⁻¹ el burbujeo que se generó creó la turbulencia suficiente como para evitar que las microalgas se depositaran.

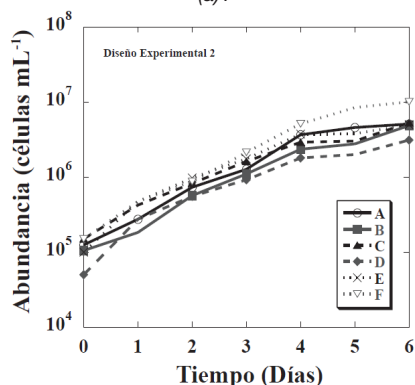
Separación de la biomasa de microalgas: Por sedimentación- floculación, con sulfato de aluminio, Al₂(SO₄)₃ 0,1g/L en una proporción de 1 mL por cada 500 mL de muestra, durante un período mínimo de 12 a 24 horas.

En la Figura 3 se presenta el resultado de la determinación del crecimiento celular en el tiempo para cultivos con presencia de oligoelementos (diseño experimental 1, Figura 3 a) y sin oligoelementos (diseño experimental 2, Figura 3b) La fase de adaptación fue de un día aproximadamente para todos los fotobiorreactores. En presencia de oligoelementos la DC máxima fue de 1,29*10⁷ células mL⁻¹ alcanzada en el Fotobiorreactor A en solo 6 días de cultivo y la mínima fue de 6,98*10⁶ células mL⁻¹ en el Fotobiorreactor C (Figura 3a).

Cuando no hay oligoelementos presentes la DC máxima fue de 1,01*10⁷ células mL⁻¹ alcanzada en el Fotobiorreactor F en solo 6 días de cultivo y la mínima fue de 3,13*10⁶ células mL⁻¹ en el Fotobiorreactor D (Figura 3b).



(a)1



(b)2

Figura 3. Crecimiento de *C. vulgaris* (células mL⁻¹) en los sistemas evaluados.

Comparando los resultados obtenidos en este trabajo con estudios anteriores, se observa que las DC alcanzadas con *C. vulgaris* fueron similares. Montero y colaboradores [10] obtuvieron DC de 2*10⁶ a 1,6*10⁷ células mL⁻¹, siendo ligeramente mayores a las obtenidas en el Fotobiorreactor

A (1,29*10⁷ células mL⁻¹), sin embargo el Fotobiorreactor C, que fue el de menor DC (6,98*10⁶ células mL⁻¹), es superior al mínimo alcanzado por Montero y colaboradores [10], en 3,88*10⁶ células mL⁻¹. En Scragg y colaboradores [15] se refieren valores de DC de 6*10⁶ células mL⁻¹ para un volumen de 2 L. Sin embargo, para el primer diseño de experimentos, el crecimiento promedio obtenido al sexto día fue de 8,95*10⁶ células mL⁻¹, siendo superior al alcanzado por estos investigadores, mientras que en el segundo diseño el promedio fue de 5,60*10⁶ células mL⁻¹, inferiores a los reportados en [15].

Tanto la aplicación de la prueba W de Mann-Whitney para comparar las medianas (mediana de muestra 1: 8,4875E6 y mediana de muestra 2: 5,075E6), como la realización de la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comparar las distribuciones de las dos muestras, arrojaron la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambos diseños, con un nivel de confianza del 95,0%. De aquí que se pueda plantear que existe una disminución significativa en el crecimiento celular cuando no hay adición de oligoelementos.

La evaluación de la influencia del pH y de la concentración de nitrógeno en la productividad de las microalgas se realizó para cada diseño de experimentos.

En presencia de oligoelementos, analizando la varianza para la DC, se observa que tanto el pH como la concentración de NaNO₃ no tuvieron una influencia significativa (P>0,05) sobre la DC (Tabla 2). Así, el 71,98% de la variabilidad observada fue debida a ambas variables. De aquí que se requiera en próximos estudios, analizar el efecto de otras variables como la densidad fotónica y el flujo de CO₂.

Tabla 2. Análisis de varianza para DC, experimentos con oligoelementos.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: pH	7,22E12	1	7,22E12	2,44	0,26
B: NaNO ₃	2,52E12	1	2,52E12	0,85	0,45
AB	5,46E12	1	5,46E12	1,85	0,31
Error total	5,92E12	2	2,96E12		
Total (corr.)	2,11E13	5			

R² = 71,98%, Estadístico Durbin-Watson = 1,74 (P=0,18)

Cuando no hay oligoelementos en el medio, analizando la varianza para la DC, se observa que tanto el pH como la concentración de NaNO₃ no tuvieron una influencia significativa (P>0,05) sobre la DC (Tabla 3). Así, el 70,74% de la variabilidad observada fue debida a ambas variables, por lo que nuevamente hubo otras variables que pudieron tener una influencia significativa en el crecimiento de las microalgas.

Tabla 3. Análisis de varianza para DC, experimentos sin oligoelementos.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: pH	6,57E12	1	6,57E12	1,63	0,33
B: NaNO ₃	5,82E12	1	5,82E12	1,44	0,35
AB	7,09E12	1	7,09E12	1,76	0,32
Error total	8,06E12	2	4,03E12		
Total (corr.)	2,75E13	5			

R² = 70,74%, Estadístico Durbin-Watson = 1,95 (P=0,29)

4. CONCLUSIONES

Se diseñó y utilizó un tipo de fotobiorreactor que permitió determinar la influencia del pH y de la concentración de nitrógeno en la productividad de las microalgas, así como la de los oligoelementos. El banco de prueba empleado en exteriores para la obtención de biomasa de microalgas de la especie *Chlorella vulgaris* en medio Bristol es efectivo en su funcionamiento, logrando valores de densidades celulares similares a las reportadas en la literatura. No hay una influencia significativa del pH y de la concentración de nitrógeno en la productividad de las microalgas en el intervalo de valores estudiados. Hay una reducción significativa del crecimiento de *C. vulgaris* en ausencia de oligoelementos.

REFERENCIAS

1. Albarracín, I. (2007) Microalgas: potenciales productoras de biodiesel. La producción de biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad, XV Simposio Electrónico Internacional, Centro de Estudios Internacionales para el Desarrollo. Octubre 1 -19. Argentina.
2. Jaramillo, J. J., Ramírez J.F., Cardona, C.A., Gil, A, Ponce, J.M. (2011) Análisis de una bio-refinería utilizando la microalga *Chlorella vulgaris*. Memorias V Simposio Internacional de Biofábricas. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, pp 103-105.
3. Sánchez, E. L. (2012) Desarrollo de un proceso para el aprovechamiento integral de microalgas para la obtención de microalgas para la obtención de biocombustibles [Tesis Doctorado]. Bucaramanga, Colombia: Universidad Industrial de Santander.
4. Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25 (3): 294-306.
5. Ola El-Ardy, S.A. Abo El-Enin, Nermine El-Sissi, Nermine A. El Semary (2012) Microalgal culture in photobioreactor for biodiesel production case studies from Egypt. *Revista Afinidad: Revista de química teórica y aplicada*, 69 (558):137-143.
6. Mulumba, N., and Farag, I. H. (2012) Tubular photobioreactor for microalgae biodiesel production, *International Journal of Engineering Science and Technology*, 4 (2): 703-709.
7. Rhodes, C. J. (2009) Oil from algae; salvation from peak oil? *Science Progress*, 92 (1): 39-90.
8. Mata, T. M., Antonio, A. and Martins, N. S. C. (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: a review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (1): 217-232.
9. Hernández, A. G., Vázquez, R., Saavedra, M. d. P. S., Carreón, L. S., & Jiménez, A. M. (2009) Biodiesel a partir de microalgas [Electronic Version], 13, 24.
10. Montero, Y., Araíz, M. A., Gómez, L. M., Hormaza, J. V., Gómez, J., Romero, T. (2012) Cultivo de microalgas para la producción de biodiesel. ICIDCA, La Habana. <https://es.scribd.com/doc/234469420/2012-Yatali-Publicacion-Algas>
11. Saucedo, Y. L. Viabilidad de implementación de un sistema de producción de biodiesel con microalgas marinas (2011) Directores: Dr. Osney Pérez, Dra. Lourdes Zunmalacárregui. Tesis de Grado Ingeniería Química. La Habana, Cuba: Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría.
12. Gómez, L. (1997) Cultivo y aplicación de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella vulgaris* en Cuba. Director: Dra. Concepción Herrero López. Universidad de La Coruña, La Coruña.
13. Piedrahita, J. A. y Montes, S. U. (2012) Diseño del sistema de alimentación y control de temperatura en un fotobiorreactor para la producción de biomasa y ácidos grasos a partir del cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris* [Tesis de Grado]. Universidad Autónoma de Occidente. Santiago de Cali, Colombia.
14. López, F. A., y Rojas, R. C. (2010) Diseño y montaje de un fotobiorreactor a escala laboratorio para la producción de microalgas [Tesis de Grado]. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.
15. Scragg, A. H., Illman, A. M., Carden, A., and Shales, S. W. (2002) Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass and Bioenergy*, 23 (1): 67-73.